



環境材料からのレジオネラ属菌検査法

栄研化学株式会社 微生物グループR&D 池戸正成

1. はじめに

レジオネラ属菌は熱性疾患や肺炎を引き起こし、生活環境中では冷却塔水に高い頻度で生育していることが報告されているが¹⁾、近年新たな感染源として温泉浴槽水、給湯・給水設備、サウナなどの循環式浴槽水をはじめとして家庭用のいわゆる24時間風呂の浴槽水の汚染が問題となっている²⁾³⁾。冷却塔水のレジオネラ属菌数と対策法については厚生省生活衛生局企画課監修の指針⁴⁾が示され、温泉浴槽水に関してもこの指針の適用が望ましいとされている³⁾。ここでは、こうした冷却塔水、浴槽水や給湯・給水設備の水を対象にしたレジオネラ属菌の検査法を紹介する。**【表1】**

2. 水検体の採取

滅菌した容器に200～500mL採水する。採水した検体は直ちに試験するのが望ましいが、できない場合は冷蔵庫(5℃)に保管する。検体はキャップ付きの遠心管に50～200mL入れ、4℃で3,000～10,000rpm 20～40分間遠心する。上清を取り除き、その上清1mLで沈殿物を懸濁する。沈殿物は遠心管のかなり上の部分まで付着しているのでピペットでいねいに洗い落とし、滅菌試験管に移す。遠心器が利用できない場合は、メンブランフィルターで検体を濾過し、フィルターから振り出す方法でも濃縮ができる。

3. 検水の酸処理

遠心で得られた懸濁液0.5mLを滅菌試験管に移し、等量の0.2M HCl-KCl緩衝液(pH2.2)(0.2M KCl, 50mLに0.2M HClを滴下しながら[7～8mL]pHメーターでpH2.2に調整する)を加え、室温(25℃)で4～20分間置く⁵⁾。この作用時間は検体中のレジオネラ属菌以外の菌の汚染量によって調整するのが望ましいが、経験的に20分間位まではレジオネラ属菌の菌数に影響がない。残った懸濁液は冷蔵庫で保管する。その他の汚染菌が多く酸処理だけで選択培地上にそれらの汚染菌が多数発育しレジオネラ属菌を検出されない場合、遠心で得られた懸濁液を50℃(温浴中)30～40分間加温処理するのが効果的である。

4. 培地への接種

酸処理あるいは加温処理した懸濁液を0.1mL WYO α 培地⁶⁾⁷⁾にコンラージ棒で塗抹する。WYO α 培地はレジオネラ属菌のいくつかの菌種(*L. gomanii*, *L. dumoffii*, *L. jordanis*)の発育を阻害する報告があることからBCYE α 培地を併用することが望ましい。使用する培地の枚数は検出率を高め、より精度の高い菌数を得るため2枚以上使用するのがよい。

培養は好気条件で35～37℃で行う。WYO α 培地でレジオネラ属菌が肉眼的に観察できる集落を形成するには通常3日以上培養が必要である。観察は7日間まで行うが、培地の乾燥を防ぐためにフラン器内に水を張ったバットを置いたり培地を容器やビニール袋に入れるなどの工夫が必要である。

5. 分離同定

レジオネラ属菌がWYO α 培地上で釣菌できる集落を形成するには通常3日以上培養が必

要である。2日以内に出現した集落はレジオネラ属菌を否定できるので、こうした集落はシャーレに印を付けるなどして区別しておくのがよい。また大きく広がる恐れがある糸状菌などの集落が観察された場合は、白金耳や滅菌したマイクロスパーテルなどでその集落ごと培地を切り捨てるとよい。

WYO α 培地上のレジオネラ属菌の集落は、灰白色、円形、湿潤して光沢があり、外辺部が透明で白金線で容易に釣菌できるのが特徴である。着色したり半球状に盛り上がった集落や、堅くて釣菌しにくい集落はレジオネラ属菌ではない。WYO α 培地やBCYE α 培地にレジオネラ属菌が発育すると独特の酸臭があり、シャーレのふたを開けたときその臭いを感じることができ、これも鑑別の一助になる。

平板培地あたりの疑わしい集落数を数え、それらのGram染色用の塗抹標本を作り、同時にBCYE α 培地、L-システインを除いたBCYE α 培地に画線する。L-システインを除いたBCYE α 培地に画線するのは、分離菌株をL-システインの要求性により鑑別するため、この目的のみで使用するには血液寒天培地などでも代用できる。この場合、画線する平板培地を八区画に区切るなどしてできるだけ多くの集落を釣菌するようにする。35～37℃で2日間培養し、BCYE α 培地にもみ発育したGram陰性桿菌で特徴ある形態を示したものをレジオネラ属菌と同定し、遠心操作での濃縮率、酸処理による希釈などを計算に入れ原水中のレジオネラ属菌の菌数を算定する。レジオネラ属菌のGram染色標本は、菌体が細く大腸菌のそれと比べて観察しにくい特徴がある。簡易に試験可能なレジオネラ属菌の特徴ある性状はL-システインの要求性以外にはなく、また【表2】に示すように各菌種で性状の違いにより同定することは困難である。馬尿酸の加水分解能は*L. pneumophila*の鑑別に有用な性状と思われる。本試験は1%馬尿酸水溶液に新鮮培養菌を一白金耳量懸濁し、18～24時間培養し、0.2mLの3.5%ニンヒドリン溶液(アセトン:ブタノール=1:1)を加えよく攪拌し、10分間培養後紫色に呈色したものを陽性、無変化あるいは黄色のものを陰性とする⁸⁾。*L. pneumophila*の血清型別あるいは限られた菌種ではあるが血清型による同定には市販の抗血清(デンカ生研)が便利である。また、核酸の相同性による同定も有用であり、簡易に試接できるキットが市販(極東製薬)されている。

参考文献

- 1) Ikedo, M et al.: Ecological studies of Legionella species I ; Viable counts of Legionella pneumoniae in cooling tower water. Microbiol. Immunol., 30: 413-423 1986.
- 2) 藪内英子, 他: 日本の温泉水中の Legionella 属菌の分布. 感染症誌, 68: 549-551, 1994.
- 3) 吉澤晋, 他: レジオネラ属菌防止指針—温泉利用入浴施設用—. 全国旅館環境衛生同業組合連会, 東京, 1995.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課: レジオネラ症防止指針. (財)ビル管理教育センター, 東京, 1994
- 5) Bopps, M. et al.: Isolation of Legionella spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium. J. Clin. Microbiol., 13: 714-719, 1981.
- 6) 奥田敬一, 他: 冷却塔水からレジオネラ属菌を検出するための新選択培地; Wadowsky-Yee-Okuda.(WYO)培地. 感染症誌, 58: 1073-1082, 1984.
- 7) 奥田敬一, 他: WYO培地の至適pHと α -ケトグルタル酸の添加効果. 臨床と微生物, 18: 823-829, 1991.
- 8) Herbert, G.A. : Hippurate hydrolysis by Legionella pneumophila. J. Clin. Microbiol., 13 : 240-242, 1981.

●レジオネラ属菌の検査手順

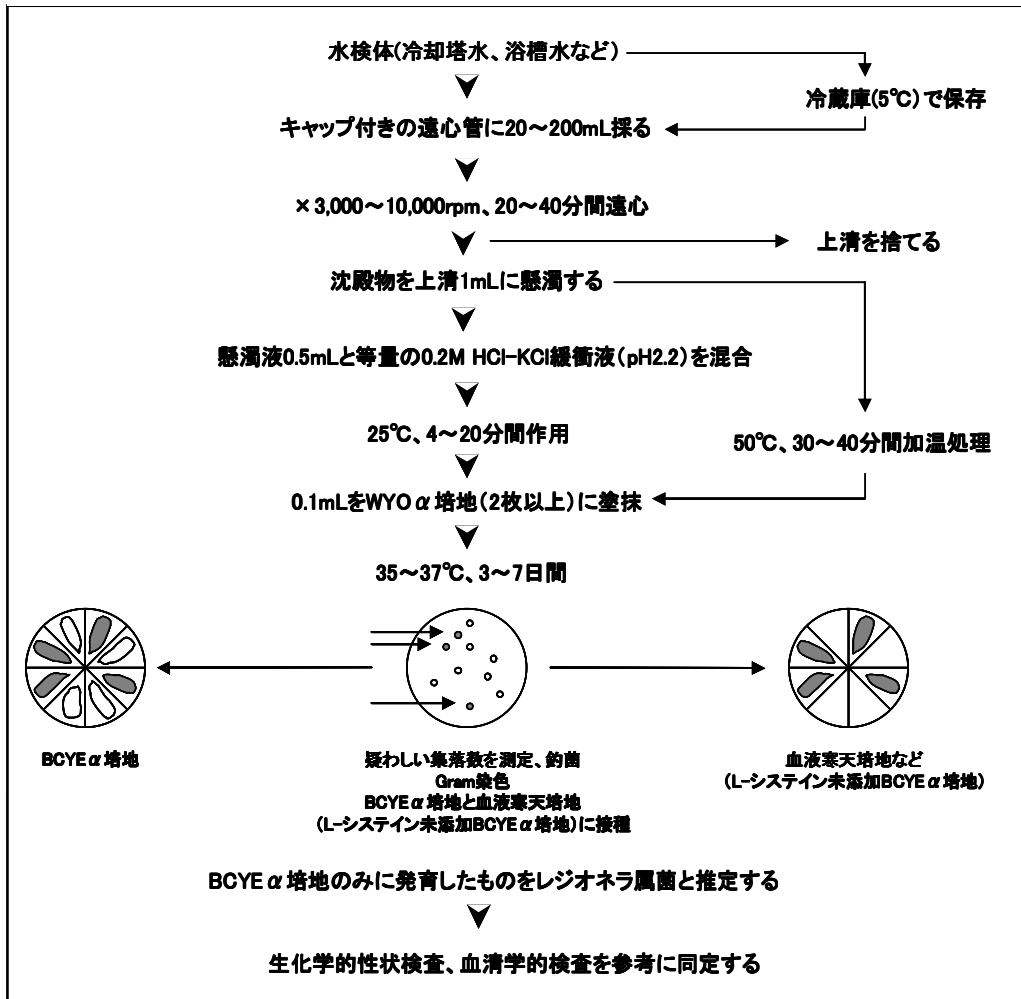


表1 レジオネラ属菌の菌数(CFU/100mL)との対策

望ましい範囲	10CFU 台 (10~90CFU)
要観察範囲	100CFU 台 (100~990CFU) 菌数の変動に注意し、上昇傾向が見られれば管理を強化する
要注意範囲	1,000~10,000CFU 台 (1,000~99,990CFU) 必要に応じて殺菌または洗浄等の対策を講じる
要緊急処置範囲	100,000CFU 以上 直ちに化学的洗浄を行い、抗レジオネラ用薬剤処理を続けながら菌数を監視する

表2 Legionella 属 39 種の性状

	オキシダーゼ	運動性	発育		システイン 要求性	紫外線による 発光 ¹⁾	ゼラチン 加水分解	馬尿酸 加水分解
			BCYE α	血液寒天				
<i>L.pneumophila</i>	(w)	+	+	-	+	-	+	+
<i>L.bozemanii</i>	(w)	+	+	-	+	+(BW)	+	-
<i>L.dumoffii</i>	-	+	+	-	+	+(BW)	+	-
<i>L.micdadei</i>	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>L.gormanii</i>	-	+	+	-	+	+(BW)	+	-
<i>L.erythra</i>	+	+	+	-	+	+(R)	+	-
<i>L.longbeachae</i>	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>L.jordanis</i>	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>L.oakridgensis</i>	-	-	+	-	- ²⁾	-	+	-
<i>L.wadsworthii</i>	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>L.feleii</i>	-	+	+	-	+	-	-	+/-
<i>L.saintthelensi</i>	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>L.nisa</i>	+	+	+	-	+	+(BW)	+	-
<i>L.maceachemii</i>	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>L.jamestowniensis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>L.rubrilucens</i>	-	+	+	-	+	+(R)	+	-
<i>L.heckeliae</i>	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>L.spiritalis</i>	+	+	+	-	+	-	+	(W)
<i>L.parisiensis</i>	+	+	+	-	+	+(BW)	+	-
<i>L.cherrii</i>	-	+	+	-	+	+(BW)	+	-
<i>L.steigerwaltii</i>	-	+	+	-	+	+(BW)	+	-
<i>L.santiacrucis</i>	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>L.israelensis</i>	-	+	+	-	+	-	(W)	-
<i>L.birminghamensis</i>	(w)	+	+	-	+	-	+	-
<i>L.cincinnatiensis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>L.moravica</i>	(w)	+	+	-	+	-	(W)	-
<i>L.brunensis</i>	-	+	+	-	+	+(BW)	-	-
<i>L.tucsonensis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>L.fairfieldensis</i>	(w)	+	+	-	+	-	-	-
<i>L.gratiana</i>	(w)	+	+	-	+	-	+	-
<i>L.adelaidensis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>L.shakespearei</i>	(w)	+	+	-	+	-	+	-
<i>L.geestiana</i>	-	+	+	-	+	-	+	(W)
<i>L.londiniensis</i>	-	-	+	-	+	-	+	(W)
<i>L.nautarum</i>	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>L.quateirensis</i>	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>L.worsleiensis</i>	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>L.lansingensis</i>	+	+	+	-	+	-	-	-

1) 長波長(365nm)の紫外線。(BW):青白色、(R):赤色 2) 初代分離の場合はシステインを要求する。(W):弱陽性